

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-093068

(43)Date of publication of application : 02.04.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12Q 1/26
C12Q 1/68
G01N 33/15
G01N 33/50
G01N 33/53
G01N 33/566

(21)Application number : 2001-291004

(71)Applicant : KOKURITSU IYAKUJIN SHOKUJIN EISEI
KENKYUSHO
IYAKUJIN FUKUSAYOU HIGAI KYUUSAI
KENKYU SHINKO CHOSA KIKO
JENOKKUSU SOYAKU KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 25.09.2001

(72)Inventor : SAWADA JUNICHI
OZAWA SHOGO
HANIOKA NOBUMITSU
SAITO YOSHIKI

(54) METHOD FOR EXAMINING MEDICINE METABOLISM BY UTILIZING POLYMORPHISM OF METABOLIC ENZYME CYP2C8 AND EXAMINATION MEDICINE, AND METHOD FOR SCREENING COMPOUND FOR IMPROVING MEDICINE METABOLISM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for controlling the dose of paclitaxel to avoid its side effects on a treatment using the paclitaxel.

SOLUTION: A method for examining is provided by utilizing a polymorphism of CYP2C8 gene to inhibit side effects due to the administration of a medicine metabolized with CYP2C8. An examination medicine for using in the method, and a screening method using the polymorphic gene are also provided.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-93068

(P2003-93068A)

(43) 公開日 平成15年4月2日 (2003.4.2)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	チーコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/26	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/26		1/68	A 4 B 0 2 4
1/68		G 0 1 N 33/15	Z 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/15		33/50	Z
33/50		33/53	M
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 13 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2001-291004(P2001-291004)	(71) 出願人	597128004 国立医薬品食品衛生研究所長 東京都世田谷区上用賀一丁目18番1号
(22) 出願日	平成13年9月25日 (2001.9.25)	(71) 出願人	598004952 医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構 東京都千代田区豊が岡3丁目3番2号 新 豊が岡ビル9階
		(71) 出願人	597177471 株式会社ジェノックス創薬研究所 茨城県つくば市東光台5-1-3
		(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志 (外1名)
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 代謝酵素 CYP2C8 の多型を利用した、薬物代謝の検査方法および検査薬並びに薬物代謝を改善する化合物のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明の目的は、パクリタキセルを用いた治療において、パクリタキセルの投与量を調節し、その副作用を避ける方法を提供することである。

【解決手段】 本発明により CYP2C8 により代謝される薬物の投与による副作用を抑制するための CYP2C8 遺伝子の多型を利用した検査方法、及び該方法において使用するための検査薬、並びに、多型遺伝子を利用したスクリーニング方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 CYP2C8量を減少させるCYP2C8遺伝子の多型を検出する工程を含む、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査方法。

【請求項2】 多型が一塩基多型である、請求項1に記載の検査方法。

【請求項3】 CYP2C8遺伝子の多型が、CYP2C8の404番目のアミノ酸変異をもたらすものである、請求項1に記載の検査方法。

【請求項4】 CYP2C8により代謝される薬物がバクリタキセルである、請求項1に記載の検査方法。

【請求項5】 以下の(a)～(c)の工程を含む、請求項1～4のいずれかに記載のCYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査方法。

(a) 被検者から調製されたDNA試料よりCYP2C8遺伝子を含むDNAを単離する工程

(b) 単離したDNA試料の塩基配列を決定する工程

(c) (b)において決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する工程

【請求項6】 以下の(a)～(d)の工程を含む、請求項1～4のいずれかに記載のCYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査方法。

(a) 1210番目の塩基を含むCYP2C8遺伝子断片をヌクレオチドプローブとして基板に固定する工程

(b) 被検者から調製されたDNA試料よりCYP2C8遺伝子の1210番目の塩基を含むDNAを単離する工程

(c) (b)で単離したDNAを(a)の基板と接触させる工程

(d) 該DNAと該基板上に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出することにより、CYP2C8遺伝子多型を検出する工程

【請求項7】 CYP2C8遺伝子の1210番目を含む領域に対応するDNAにハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査法。

【請求項8】 CYP2C8遺伝子の1210番目を含む領域に対応するDNAにハイブリダイズするように設計されたフォワードプライマー及びリバースプライマーを含む、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査法。

【請求項9】 CYP2C8遺伝子の1210番目を含む領域に対応するDNAを増幅するように設計されたフォワードプライマー及びリバースプライマーを含む、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査法。

【請求項10】 以下の(a)～(d)の工程を含む、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性を上昇させる医薬品候補化合物のスクリーニング方法。

(a) 404番目のアミノ酸残基がアラニンであるCYP2C8を発現する細胞を提供する工程

(b) 該細胞に対し被験化合物を接触させる工程

(c) 被験化合物を接触させた細胞におけるCYP2C8活性

を検出する工程

(d) 被験化合物が接触させない場合の活性と比較して、(c)で検出された活性を増加させる化合物を選択する工程

【請求項11】 CYP2C8活性がバクリタキセル6 α -ヒドロキシラーゼ活性である、請求項10に記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、蛋白質またはそれをコードする遺伝子の多型を検出することにより、薬物に対する感受性を予測する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】一般に、薬物は患者の示す疾患、症状等に応じて投与されるものであるが、個々の患者の薬物に対する反応性には差違がある。しかしながら、従来、そのような個々の患者の薬物感受性に応じて薬物を投与することは困難であった。通常、投与された薬物は、肝臓の薬物代謝酵素によってより水溶性の物質へと変換され体外に排出されるものである。このような薬物代謝酵素としては特に薬物、ステロイド、発癌物質、毒薬のような外因性の化学物質、並びに、ステロイド及び脂肪酸等の内因性の化合物等の酸化代謝を触媒するヘム蛋白質、シトクロムP450 (CYP) を挙げることができる。ヒト肝臓中には20種以上のCYPの分子種が含まれている。CYPは多くの薬物の代謝に関与し、薬物の体内での動態を律定している。従って、薬物の薬効と安全性を知るためには、特定の薬物がCYPのどの分子種により代謝されるのか、また、いずれかの分子種の活性を阻害若しくは誘導しないか等について正確に知ることが重要である。

【0003】最近の遺伝子解析の進歩に伴い、薬物に対する患者の反応性を患者の遺伝子型によって分類することができるという報告がある。CYP遺伝子については、一塩基多型 (SNPs) によりシトクロームの代謝活性が弱められたり、増強されたりすることも知られている (Yokoi T. 及び Kanataki T., *Pharma. Res.* 15:517-524 (1998); Ingelman-Sundberg M. et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 20:342-349 (1999))。

【0004】CYP2C8遺伝子は、染色体10q24.1に位置し (Inoue K. et al., *J. Hum. Genet.* 39:337-343 (1994))、9個のエクソンから構成される遺伝子である (Kloster T. et al., *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 13:289-295 (1999))。この型のCYPは肝臓、並びに、腎臓、副腎、膵、子宮等を含む多くの肝臓以外の組織で発現されている (前述のKloster T. S. et al.)。CYP2C8は、抗癌薬バクリタキセル (Rahman A. et al., *Cancer Res.* 54:554-5546 (1994); Sonnenschein D. S. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275:566-575 (1995))、BMG-CoAレダクターゼ阻害剤セリバスタチン (Muck W., *Clin. Pharmacokin.* 39:99-116 (2000))、抗悪性薬カルマゼピン (Ker

r B.M. et al., Biochem Pharmacol, 47:1969-1979 (1994)), 抗糖尿病薬トログリタゾン (Yamazaki H. et al., Drug Metab. Dispos., 27:1260-1266 (1999)), 及び、抗不整脈薬アミオダロン (Ohyama K. et al., Drug Metab. Dispos., 28:1303-1310 (2000)) 等の治療薬の代謝に重要な役割を果たしている。CYP2C8はまた、全トランス-レチノイン酸及びアラキドン酸を含むレチノイド、並びに脂肪酸の酸化に関与していることが知られている (Nadim L. et al., Biochem Pharmacol, 58:1201-1208 (1999); Rifkind A.B. et al., Arch. Biochem. Biophys., 320:380-389 (1995))。

【0005】CYP2C8については、CYP2C8性媒パクリタキセル 6 α -ヒドロキシ化の活性、並びに、ロシグリタゾンのN-脱メチル化、及び ω -ヒドロキシ化の活性が、ヒト肝臓パネルからのミクロソームで、最大38倍まで異なることが報告されている (前述、Sonnichsen D.S., Baldwin S.J. et al., Br. J. Clin. Pharmacol., 48:24-432 (1999))。しかしながら、そのような活性に影響するCYP2C8の多型性、特に日本人における多型性についてはほとんど知られていない。

【0006】ところで、CYP2C8がその代謝に関与するパクリタキセルは、最初にイチイ属*Taxus brevifolia*より単離されたタキソールとも呼ばれるジテルペン誘導体のアルカロイドである (Wani M.C., J. Am. Chem. Soc., 93:325 (1971))。微小管重合を促進することにより複製を抑制する抗癌剤であり、卵巣癌、非小細胞肺癌、乳癌、及び胃癌に対して効果を有することが知られている (例えば、Kingston D.G.I. et al., Studies in Organic Chemistry 26, pp.219-235, Attaur-Rahman, P.W. Le Que sneff, Elsevier, Amsterdam (1986))。パクリタキセルの生体内での代謝の主経路としては、CYP2C8により6 α -ヒドロキシパクリタキセルに酸化され胆汁中へ排泄される。パクリタキセルの使用による副作用 (骨髄抑制、肝障害、嘔吐、脱毛、関節痛、発熱等) も報告されている。前述の生体内パクリタキセル代謝に働くCYP2C8の活性が弱い場合、血中及び臓器におけるパクリタキセル濃度が上昇し、高い濃度が持続されることが副作用が強くあらわれると考えられる。従って、CYP2C8の代謝能に関連する遺伝子変異を調べ、患者のCYP2C8代謝能に応じた量のパクリタキセルを投与することにより、副作用の発現を抑制することが可能となると考えられる。

【0007】Web site (<http://www.imm.ki.se/CYPalle1es/>) には、CYPの変異体についての情報が公開されている。このWeb site上の情報によると269位のアミノ酸がイソイソシンからフェニルアラニンに変異したCYP2C8*2はパクリタキセル 6 α -ヒドロキシラーゼについての K_m が増加する。また、139位及び399位の2つのアミノ酸が変異した対立遺伝子CYP2C8*3は、本実験において検出されたg116a/a1196g; R139K/K399R (変異1) と同じものであると思われる、パクリタキセル代謝が野生型と比べ減少し

ていると説明されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、CYP2C8により代謝される薬物を医薬品として投与する場合に、CYP2C8により代謝される薬物の投与量を調節し、その副作用を避ける方法を提供することである。即ち、本発明の目的はCYP2C8により代謝される薬物の投与による副作用を抑制するためのCYP2C8遺伝子の多型性を利用した検査方法、及び該方法において使用するための検査薬、並びに、多型遺伝子を利用したスクリーニング方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】即ち、発明者らは、パクリタキセルの生体内での代謝に関与するCYP2C8における遺伝子多型を検出することを目的とし、日本人集団由来の73種の樹立細胞株を用いて9箇のSNPsをCYP2C8遺伝子中に検出した。4つのSNPsはエクソン中に、他の4つはイントロン中、そしてもう1つは3'-非翻訳領域 (3'-UTR) 中に位置していた。そのうち、3つのエクソンのSNPsは、アミノ酸の変異を起こすものであった (g416a, R139K; a1196g, K399R; c1210g, P404A)。

【0010】これらのアミノ酸変異のCYP2C8機能に対する効果を試験するため、野生型および4種の変異体CYP2C8 cDNA構築物 (R139K, K399R, R139K/K399R、及びP404A) を作成し、Hep G2細胞トランスフェクトし、それらのパクリタキセル 6 α -ヒドロキシラーゼ活性をin vitroで試験した。その結果、後の実施例において示すように変異体P404Aの発現レベルは野生型の発現レベルと比べて半分近くに減少していた。一方、変異型K399Rの発現レベルもまた同じように減少していたが、加法的な変異R139Kを行いR139K/K399Rとすることにより発現レベルはもとに戻るようであった。蛋白質レベルが減少する変異体K399R及びP404AをトランスフェクトしたHep G2細胞中のmRNAレベルを調べると、野生型のmRNAレベルとほとんど変わらなかった。後述の実施例において示すように、本発明のCYP2C8変異体のパクリタキセル 6 α -ヒドロキシラーゼ活性を調べ、R139K/K399Rの活性の減少は酵素蛋白質自体の活性の低下により、P404Aにおける低下は、蛋白質量の減少のためと考えられた。

【0011】本発明により、抗癌剤パクリタキセルの代謝に関与している酵素CYP2C8の新規SNPsが見出された。本発明のSNPの存在は、CYP2C8量を抑制するものであった。CYP2C8により代謝される薬物の投与前に、これらのSNPsを調べることにCYP2C8により代謝される薬物の投与量を調節し、副作用の発現を抑制することが可能である。即ち、本発明はパクリタキセル等のCYP2C8により代謝される薬物の投与による副作用を抑制するためのCYP2C8遺伝子の多型性を利用した検査方法、及び該方法において使用するための検査薬に関する。また、該多型遺伝子を利用したスクリーニング方法に関する。より具体的

には、(1) CYP2C8量を減少させるCYP2C8遺伝子の多型を検出する工程を含む、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査方法、(2) 多型が一塩基多型である、(1)に記載の検査方法、(3) CYP2C8遺伝子の多型が、CYP2C8の404番目のアミノ酸変異をもたらすものである、(1)に記載の検査方法、(4) CYP2C8により代謝される薬物がバクリタキセルである、(1)に記載の検査方法、(5)以下の(a)～(c)の工程を含む、

(1)～(4)のいずれかに記載のCYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査方法、(a)被検者から調製されたDNA試料よりCYP2C8遺伝子を含むDNAを単離する工程(b)単離したDNA試料の塩基配列を決定する工程(c)(b)において決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する工程(6)以下の(a)～(d)の工程を含む、(1)～(4)のいずれかに記載のCYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査方法、(a)1210番目の塩基を含むCYP2C8遺伝子断片をヌクレオチドプローブとして基板上に固定する工程(b)被検者から調製されたDNA試料よりCYP2C8遺伝子の1210番目の塩基を含むDNAを単離する工程(c)(b)で単離したDNAを(a)の基板と接触させる工程(d)該DNAと該基板上に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出することにより、CYP2C8遺伝子多型を検出する工程、(7) CYP2C8遺伝子の1210番目を含む領域に対応するDNAにハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査薬、(8) CYP2C8遺伝子の1210番目を含む領域に対応するDNAにハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板からなる、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査薬、(9) CYP2C8遺伝子の1210番目を含む領域に対応するDNAを増幅するように設計されたフォワードプライマー及びリバースプライマーを含む、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査薬、(10)以下の(a)～(d)の工程を含む、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性を上昇させる医薬品候補化合物のスクリーニング方法、(4)404番目のアミノ酸残基がアラニンであるCYP2C8を発現する細胞を提供する工程(b)該細胞に対し被験化合物を接触させる工程(c)被験化合物を接触させた細胞におけるCYP2C8活性を検出する工程(d)被験化合物が接触させない場合の活性と比較して、(c)で検出された活性を増加させる化合物を選択する工程、(11) CYP2C8活性がバクリタキセル6- α -D-ヒドロキシラーゼ活性である、(10)に記載のスクリーニング方法、に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明者により、CYP2C8遺伝子(GenBank Accession No. NM000770; NM 000770のヌクレオチド配列中24番目のATGのAを1番目の塩基とし、これに対応するメチオニンを1番目のアミノ酸残基とす

る)の416番目の塩基GがAに、1196番目の塩基AがGに、及び、1210番目の塩基CがGに変異することにより、各々、139番目のアミノ酸残基がアルギニンからリジン、399番目がリジンからアルギニン、404番目がプロリンからアラニンに変異したCYP2C8が発見された(各々、g146a/R139K、a1196g/K399R、c1210g/P404A)。このうち、CYP2C8の404番目のアミノ酸が変異したP404Aは新規なSNPを含む塩基配列によりコードされるものであった。この変異の結果、CYP2C8により代謝される薬物の生体内での代謝がCYP2C8量の低下により下がり、それらの薬物が体内に蓄積し、副作用が発現しやすいと考えられる。従って、バクリタキセル等のCYP2C8により代謝される薬物を投与する前にこのような変異について検査することにより、投与量を調節することによりCYP2C8により代謝される薬物の副作用の発現を抑制することが可能となる。

【0013】多型とは、遺伝学的には、人口中1%以上の頻度で存在している1遺伝子におけるある塩基の変化と一般的には定義される。しかしながら、本発明の「多型」はこの定義に制限せず、1%未満の塩基の変化であっても「多型」を含む。本発明における多型の種類としては、例えば、一塩基多型(SNP)から数十塩基が欠失、置換あるいは挿入されている多型等が挙げられるが、これらに制限されるものではない。さらに、多型部位の数についても特に制限はなく、1個以上の多型を有していてもよい。例えば、CYP2C8遺伝子の1210番目の塩基GがCからGに変異し、その結果、CYP2C8の404番目のアミノ酸残基をプロリンからアラニンへと変異させる多型を挙げることができる。しかしながら、本発明の多型はこれに制限されるものではなく、CYP2C8量を減少させるものであれば本発明の「多型」に含まれる。

【0014】ある多型を含むことにより、CYP2C8量が減少しているかどうかを調べる手段としては以下のような工程を含む方法を例示することができる。

- (1)多型を含むCYP2C8遺伝子を発現する発現ベクターを構築する
- (2)該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入する
- (3)該宿主細胞をCYP2C8が発現される条件下で培養する
- (4)CYP2C8の発現レベルを調べ、野生型のCYP2C8遺伝子を導入した場合の結果と比較する
- 発現レベルは、CYP2C8に対する抗体を用いたウエスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、酵素結合免疫測定法(ELISA)、及び免疫蛍光法等により決定することができる。

【0015】また、本発明のCYP2C8により代謝される薬物とは、CYP2C8の作用により生体内で代謝される物質である。例えば、バクリタキセル、アミオダロン、セリバスタン、カルマゼピン等を挙げることができるが、これらの例示に限定されるものではない。

【0016】本発明の検査方法の一つの態様は、CYP2C8

量を減少させるCYP2C8遺伝子の多型を指標とする方法である。本発明により、CYP2C8量を減少させるような、CYP2C8遺伝子に生じた多型を検出する工程を含む、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査方法を提供する。

【0017】本発明においてCYP2C8遺伝子に生じた多型は、その多型の種類、数、部位は特に限定されないが、CYP2C8の発現量を減少させるものであり、好ましくはCYP2C8の404番目のアミノ酸残基を変異させるものである。即ち、CYP2C8をコードする遺伝子の404番目のアミノ酸に対応する部分の塩基のうち1〜3個が置換した多型が特に好ましい。

【0018】上記検査方法において、CYP2C8遺伝子に生じた多型の検出は、例えば、被検者のCYP2C8遺伝子の塩基配列を直接決定することにより行うことができる。この方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。DNA試料は、例えば被検者の末梢血白血球、肝臓、腎臓、脾臓、脳、子宮等の組織または細胞から抽出した染色体DNA、あるいはRNAを基に調製することができる。

【0019】本方法においては、次いで、CYP2C8遺伝子を含むDNAを単離する。該DNAの単離は、CYP2C8遺伝子にハイブリダイズするプライマーを用いて、染色体DNA、あるいはRNAを鋳型としたPCR等によって行うことも可能である。本方法においては、次いで、単離したDNAの塩基配列を決定する。単離したDNAの塩基配列の決定は、当業者に公知の方法で行うことができる。

【0020】本方法においては、次いで、決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する。本方法における対照とは、正常な(野生型)CYP2C8遺伝子の配列を言う。一般に健康人のCYP2C8遺伝子の配列は正常であるものと考えられることから、上記工程の「対照と比較する」とは、通常、健康人のCYP2C8遺伝子の配列と比較することを意味するが、GenBankに野生型として登録されているCYP2C8遺伝子の配列(NM00070)と比較してもよい。このような比較の結果、被検者のCYP2C8遺伝子の配列が対照と異なっていた場合には、上述のように該多型を含むCYP2C8遺伝子により発現されるCYP2C8量を調べる。その結果、CYP2C8量が減少していれば、被検者はバクシタキセル等のCYP2C8により代謝される薬物に対する代謝能が低く、それらの薬物の投与による副作用が生じやすいと判定される。

【0021】本発明の検査方法は、上記の如く直接被検者由来のDNAの塩基配列を決定する方法以外に、多型の検出が可能な種々の方法によって行うことができる。例えば、本発明における多型の検出は、以下のような方法によっても行うことができる。まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、調製したDNA試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する。また、他の一つの態様においては、ま

ず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、CYP2C8遺伝子を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを対照と比較する。

【0022】このような方法としては、例えば、制限酵素断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP)を利用した方法やPCR-RFLP法等が挙げられる。具体的には、制限酵素の認識部位に変異が存在する場合、あるいは制限酵素処理によって生じるDNA断片内に塩基挿入または欠失がある場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが対照と比較して変化する。この変異を含む部分をPCR法によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、染色体DNAをこれらの制限酵素を用いて処理し、電気泳動した後、本発明のプロブDNAを用いてサザンブロッティングを行うことにより、変異の有無を検出することができる。用いられる制限酵素は、それぞれの変異に応じて適宜選択することができる。この方法では、ゲノムDNA以外にも被検者から調製したRNAを逆転写酵素でcDNAにし、これをそのまま制限酵素で切断した後、サザンブロッティングを行うことも可能である。また、このcDNAを鋳型としてPCRでCYP2C8遺伝子を含むDNAを増幅し、それを制限酵素で切断した後、移動度の差を調べることも可能である。

【0023】さらに別の方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、CYP2C8遺伝子を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる。次いで、解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する。分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する。

【0024】該方法としては、例えばPCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型)法(Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis is of anonymous Alu repeats on chromosome 11. Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146. Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis is of polymerase chain reaction products. Oncogene. 1991 Aug 1; 6(8): 1313-1318. Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with postlabeling. PCR Methods Appl. 1995 Apr 1; 4(5): 275-282.)が挙げられる。この方法は操作が比較的簡便であり、また被検試料の量も少なく済む等の利点を有するため、特に多数のDNA試料をスクリーニングするのに好適である。その原理は次の通りである。二本鎖DNA断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離したDNA鎖を、変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル

中で電気泳動すると、それぞれの高次構造の差に応じて、相補的な同じ鎖長の本鎖DNAが異なる位置に移動する。塩基の置換によってもこの一本鎖DNAの高次構造は変化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の変化を検出することによりDNA断片に点突然変異や欠失、あるいは挿入等による変異が存在することを検出することができる。

【0025】具体的には、まず、CYP2C8遺伝子を含むDNAをPCR法等によって増幅する。増幅される範囲としては、通常200~400bp程度の長さが好ましい。PCRは、当業者においては反応条件等を適宜選択して行うことができる。PCRの際に、³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識したプライマーを用いることにより、増幅DNA産物を標識することができる。あるいはPCR反応に³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を加えてPCRを行うことにより、増幅DNA産物を標識することも可能である。さらに、PCR反応後にクレノウ酵素等を用いて、³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を、増幅DNA断片に付加することによっても標識を行うことができる。こうして得られた標識DNA断片を、熱を加えること等により変性させ、尿素などの変性剤を含まないポリアクリルアミドゲルによって電気泳動を行う。この際、ポリアクリルアミドゲルに適量（5から10%程度）のグリセロールを添加することにより、DNA断片の分離の条件を改善することができる。また、泳動条件は各DNA断片の性質により変動するが、通常、室温（20から25℃）で行い、好ましい分離が得られないときには4から30℃までの温度で最速の移動度を与える温度の検討を行う。電気泳動後、DNA断片の移動度を、X線フィルムを用いたオートラジオグラフィや、蛍光を検出するスクリーン等で検出し、解析を行う。移動度に差があるバンドが検出された場合、このバンドを直接ゲルから切り出し、PCRによって再度増幅し、それを直接シーケンシングすることにより、変異の存在を確認することができる。また、標識したDNAを使わない場合においても、電気泳動後のゲルをエジウムブロマイドや銀染色法などによって染色することによって、バンドを検出することができる。

【0026】さらに別の方法は、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、CYP2C8遺伝子を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する。次いで、分離したDNAのゲル上での移動度を対照と比較する。このような方法としては、例えば、変性剤濃度勾配ゲル（denaturing gradient gel electrophoresis：DGGE法）等を示すことができる。DGGE法は、変性剤の濃度勾配のあるポリアクリルアミドゲル中で、DNA断片の混合物を泳動し、それぞれの不安定性の違いによってDNA断片を分離する方

法である。ミスマッチのある不安定なDNA断片が、ゲル中のある変性剤濃度の部分まで移動すると、ミスマッチ周辺のDNA配列はその不安定さのために、部分的に1本鎖へと解離する。この部分的に解離したDNA断片の移動度は、非常に速くなり、解離部分のない完全な二本鎖DNAの移動度と差がつくことから、両者を分離することができる。具体的には、CYP2C8遺伝子を含むDNAを本発明のプライマー等を用いたPCR法等によって増幅し、これを尿素などの変性剤の濃度が移動するに従って徐々に高くなっているポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、対照と比較する。変異が存在するDNA断片の場合、より低い変性剤濃度位置でDNA断片が一本鎖になり、極端に移動速度が速くなるため、この移動度の差を検出することにより変異の有無を検出することができる。

【0027】さらに別の方法は、まず、被検者から調製したCYP2C8遺伝子を含むDNA、および該DNAとハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板、を提供する。次いで、該DNAと該基板を接触させる。さらに、基板に固定されたヌクレオチドプローブにハイブリダイズしたDNAを検出することにより、CYP2C8遺伝子多型を検出する。このような方法としては、DNAアレイ法（SNP遺伝子多型の戦略、松原謙一・榎佳之、中山書店、p128-135）が例示できる。被検者からのCYP2C8遺伝子を含むDNA試料の調製は、当業者に周知の方法で行うことができる。該DNA試料の調製の好ましい態様においては、例えば被検者の末梢白血球、肝臓、腎臓、副腎、脳、子宮等の組織または細胞から抽出した染色体DNAを基に調製することができる。染色体DNAから本方法のDNA試料を調製するには、例えばCYP2C8遺伝子を含むDNAにハイブリダイズするプライマーを用いて、染色体DNAを鋳型としたPCR等によってCYP2C8遺伝子を含むDNAを調製することも可能である。調製したDNA試料には、必要に応じて、当業者に周知の方法によって検出のための標識を施すことができる。

【0028】本発明において「基板」とは、ヌクレオチドを固定することが可能な板状の材料を意味する。本発明においてヌクレオチドには、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドが含まれる。本発明の基板は、ヌクレオチドを固定することが可能であれば特に制限はないが、一般にDNAアレイ技術で使用される基板を好適に用いることができる。

【0029】一般にDNAアレイは、高密度に基板にプリントされた何千ものヌクレオチドで構成されている。通常これらのDNAは非透過性（non-porous）の基板の表層にプリントされる。基板の表層は、一般的にはガラスであるが、透過性（porous）の膜、例えばニトロセルロースメンブレンを使用することができる。

【0030】本発明において、ヌクレオチドの固定（アレイ）方法として、Affymetrix社開発によるオリゴヌクレオチドを基本としたアレイが例示できる。オリゴヌク

レオチドのアレイにおいて、オリゴヌクレオチドは通常インサイチュ (in situ) で合成される。例えば、photolithographicの技術 (Affymetrix社)、および化学物質を固定させるためのインクジェット (Rosetta Inpharmatics社) 技術等によるオリゴヌクレオチドのインサイチュ合成法が既に知られており、いずれの技術も本発明の基板の作製に利用することができる。

【0031】基板に固定するヌクレオチドプローブは、CYP2C8遺伝子の多型を検出することができるものであれば、特に制限されない。即ち該プローブは、例えば、野生型のCYP2C8遺伝子、あるいは多型を有するCYP2C8遺伝子と特異的にハイブリダイズするようなプローブである。特異的なハイブリダイズが可能であれば、ヌクレオチドプローブは、検出するCYP2C8遺伝子を含むDNA、または多型を有するCYP2C8遺伝子に対し、完全に相補的である必要はない。

【0032】本発明において基板に結合させるヌクレオチドプローブの長さは、オリゴヌクレオチドを固定する場合は、通常10~100ベースであり、好ましくは10~50ベースであり、さらに好ましくは15~25ベースである。

【0033】本発明においては、次いで、該cDNA試料と該基板を接触させる。本工程により、上記ヌクレオチドプローブに対し、DNA試料をハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの反応液および反応条件は、基板に固定するヌクレオチドプローブの長さ等の諸要因により変動するが、一般的に当業者に周知の方法により行うことができる。

【0034】本発明においては、次いで、該DNA試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの有無または強度を検出する。この検出は、例えば、蛍光シグナルをスキャナー等によって読み取ることによって行うことができる。尚、DNAアレイにおいては、一般的にスライドガラスに固定したDNAをプローブといい、一方溶液中のラベルしたDNAをターゲットという。従って、基板に固定された上記ヌクレオチドを、本明細書においてヌクレオチドプローブと記載する。

【0035】上記の方法以外にも、特定位置の変異のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド (Allele Specific Oligonucleotide/ASO) ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これと試料DNAでハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンブロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法、等により検出することができる。また、リボヌクレアーゼAミスマッチ切断法による検出も可能である。具体的には、CYP2C8遺伝子を含むDNAをPCR法等によって増幅し、これをプラスミドベクター等に組み込んだCYP2C8遺伝子cDNA等から調製し

た標識cDNAとハイブリダイゼーションを行う。変異が存在する部分においてはハイブリッドが一本鎖構造となるので、この部分をリボヌクレアーゼAによって切断し、これをオートラジオグラフィ等で検出することによって変異の存在を検出することができる。

【0036】その他の本発明の多型の検出が可能な方法としては、

- 1) 質量分析法による方法 (Griffin TJ and Smith LM, *Trends Biotechnol.*, vol.18, pp77-84, (2000))、
- 2) Taq-Man PCRによる方法 (Livak KJ, *Genet. Anal.*, vol.14, pp143-149, (1999)、CYPへの応用例: Hiratsuka M et al., *Biol. Pharm. Bull.*, vol.23, pp1131-1135, (2000))、
- 3) Pyrosequencingによる方法 (Ahmadian A et al., *Anal. Biochem.*, vol. 280, pp103-110, (2000))、
- 4) Invader法による方法 (Lyamichev V et al., *Nat. Biotechnol.*, vol. 17, pp292-296, (1999)、メディカル出版社発行「遺伝子医学」vol.4, No.1, pp44-51およびpp68-72 (2000))

を挙げることができる。以上、種々の検出方法を例示したが、これらに限らず、CYP2C8遺伝子の発現量を減少させる本発明のCYP2C8遺伝子に生じた多型の検出を可能にする方法であれば、いかなる方法を用いることができる。

【0037】本発明はまた、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性を検査するための検査薬を提供する。その一つの態様は、CYP2C8遺伝子の1210番目を含む領域に対応するDNAにハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査薬である。これは遺伝子多型を指標とする検査法に使用される。

【0038】該オリゴヌクレオチドは、CYP2C8遺伝子を含むDNAに特異的にハイブリダイズするものである。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストレンジメントなハイブリダイゼーション条件下 (例えば、サムブルックら, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第2版1989年に記載の条件)

において、他のタンパク質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションを有意に生じないことを意味する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、該オリゴヌクレオチドは、検出するCYP2C8遺伝子の塩基配列に対し、完全に相補的である必要はない。

【0039】該オリゴヌクレオチドは、上記本発明の検査法におけるプローブやプライマーとして用いることができる。該オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、その長さは、通常15bp~100bpであり、好ましくは17bp~30bpである。プライマーは、多型部分を含むCYP2C8遺伝子の少なくとも一部を増幅しうるものであ

れば、特に制限されない。また、上記オリゴヌクレオチドをプローブとして使用する場合は、該プローブは、CYP2C8遺伝子の1210番目の塩基を含む領域に対応するDNAに特異的にハイブリダイズするものであれば、特に制限されない。該プローブは、合成オリゴヌクレオチドであってもよく、通常少なくとも15bp以上の鎖長を有する。

【0040】本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得される二本鎖DNA断片として作製することもできる。

【0041】本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合は、適宜標識して用いることが好ましい。標識する方法としては、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、オリゴヌクレオチドの5'端を³²Pでリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等のDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法等）を例示することができる。

【0042】また、本発明における検査薬の別の態様は、CYP2C8遺伝子の1210番目の塩基を含む領域に対応するDNAとハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板からなるCYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査薬である。これは遺伝子多型を指標とする検査に使用される。これらの調製方法に関しては、上述の通りである。

【0043】また、本発明における検査薬の別の態様は、CYP2C8遺伝子の1210番目を含む領域に対応するDNAを増幅するように設計されたフォワードプライマー及びリバースプライマーを含む、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性の検査薬である。プライマーの長さは、通常15bp~100bpであり、好ましくは17bp~30bpである。プライマーは、多型部分を含むCYP2C8遺伝子の少なくとも一部を増幅しうるものであれば、特に制限されない。

【0044】上記の検査薬においては、有効成分であるオリゴヌクレオチド以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤（BSAやゼラチンなど）、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

【0045】また本発明は、CYP2C8により代謝される薬物に対する代謝活性を上昇させる医薬品候補化合物のスクリーニング方法を提供する。上記スクリーニング方法の一つの態様は、CYP2C8の活性を指標とする方法である。本方法においては、まず、404番目のアミノ酸残基がアラニンであるCYP2C8遺伝子を発現する細胞に、被験化合物を接触させる。用いられる「細胞」の由来としては、例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、ウシ、ブタ、イヌ等由来する細胞が挙げられるが、これらの由

来に制限されない。「404番目のアミノ酸残基がアラニンであるCYP2C8遺伝子が発現する細胞」としては、内因性の404番目のアミノ酸残基がアラニンであるCYP2C8遺伝子が発現している細胞、または外因性の遺伝子が導入され、該遺伝子が発現している細胞を利用することができる。外因性の404番目のアミノ酸残基がアラニンであるCYP2C8遺伝子が発現した細胞は、通常、該遺伝子が挿入された発現ベクターを宿主細胞へ導入することができる。該発現ベクターは、一般的な遺伝子工学技術によって作製することができる。

【0046】本方法に用いる被検化合物としては、例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチドなどの単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物生産物、海洋生物抽出物、植物抽出物等を挙げることができる。

【0047】404番目のアミノ酸残基がアラニンであるCYP2C8遺伝子が発現する細胞への被検化合物の「接触」は、通常、該遺伝子を発現する細胞の培養液に被検化合物を添加することによって行うが、この方法に限定されない。被検化合物がタンパク質等の場合には、該タンパク質を発現するDNAベクターを、該細胞へ導入することにより、「接触」を行うことができる。

【0048】本方法においては、次いで、該遺伝子の発現産物であるCYP2C8の活性を測定する。CYP2C8の活性の測定は、CYP2C8により代謝される薬物、例えば、バリタキセル、アミオダロン、セリバスタチン及びカルマゼピン等、並びに、レチノイド及び脂肪酸等を酸化して活性を測定することにより測ることができる。

【0049】例えば、バリタキセルはCYP2C8により酸化され6 α -ヒドロキシリタキセルに変換される。このようなバリタキセル6 α -ヒドロキシラーゼ活性の測定方法については、例えば、Walle T. (Methods Enzymol. 272:145-151 (1996)) により報告されている。

【0050】本方法においては、次いで、測定したCYP2C8活性を、被検化合物の非存在下において測定した場合と比較して、活性を上昇させる化合物を選択する。このようにして選択された化合物は、抗瘧薬バリタキセル、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤セリバスタチン、抗瘧薬カルマゼピン、抗糖尿病薬トログリタゾン、及び、抗不整脈薬アミオダロン等のCYP2C8により代謝される治療薬を投与する際に併用することにより、それらの治療薬による副作用を抑制するのに役立つと考えられる。また、全トランス-レチノイン酸及びアラキドン酸を含むレチノイド、並びに脂肪酸の酸化に関与する疾病の治療または予防のための医薬品候補化合物となる。

【0051】本発明のスクリーニング方法により取得される化合物は、分子自体を被検者に投与することも可能であるが、一般的に公知の製剤学的方法により製剤化して投与することも可能である。例えば経口投与の場合、

錠剤、散剤、カプセル剤、懸濁液剤等、経皮投与の場合、ハップ剤等を示すことができるが、これらに制限されない。投与方法として、投与方法は、治療効果や予防効果を示し得る限り特に制限はなく、例えば経口投与、経皮投与、注射による血中投与等が考えられる。これらの化合物がDNAである場合、該DNAを生体内に投与する際には、レトロウイルス、アデノウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターやリポソーム等の非ウイルスベクター、或いは、naked DNAの形態で利用することができる。投与方法としては、in vivo法およびex vivo

【0052】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら制限されるものではない。

【実施例1】 CYP2C8遺伝子多型の検出

DNA抽出

73人の異なる日本人由来樹立セルラインは、ヒューマンサイエンス研究資源バンク (Osaka, Japan)、または、国立医薬品食品衛生研究所のJapanese Collection of Research Biosources (Tokyo, Japan)より得た。細胞は各バンクの説明書に従って培養した。DNA抽出は、およそ 1×10^6 細胞から、Blood and Cell Culture DNA Kit (Qia

位置	WT00878 上の位置	ATGからの 位置	3'UTR 変異	アミノ酸 変異	146 対立遺伝子 中の頻度
intron 2	136306	-5~exon3	T挿入		42
exon 3	136395	416	G/A	R139K	1
intron 3	136686	-22~exon4	T欠失		6
	136687	-21~exon4	T/A		3
exon 5	164977	1195	A/G	K399R	1
	164991	1210	C/G	P404A	1
	165011	1230	C/T	G410G	1
intron 8	165178	+106~exon8	G/A		48
3' -UTR	166665	+24~終止コ ドン	T/C		33

【0056】 【実施例2】 CYP2C8変異体の発現

プラスミド構築

完全長野生型CYP2C8断片をHuman Adult Normal Liver c DNA (Biochain Institute Inc., Hayward, CA)から5'-AAGGCTTCAATGGACCTT-3' (配列番号:1) のフォワードプライマー、及び、5'-TCAGACCCAGATGGGCTAGC-3' (配列番号:2) のリバースプライマーを用いて増幅した。PCR産物は直接pCR3.1ベクター (Invitrogen, Groningen, Netherlands) に、Eukaryotic TA Cloning Kit (Invitrogen)を用いてクローニングした。Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA)及び野生型CYP2C8/pCR3.1プラスミドを鋳型として用いて、3個の単一-CYP2C8変異体(g416A, R139K; g1196A, K399R; c1210g, P404A)、及び、1個の二重変異体(R139K/K399R)を構築した。野生型、及び、その変異体の全配列をDNA

gen, Hilden, Germany)を用いて行なった。得られたDNAの濃度は、UV吸収により測定し、DNA溶液は配列決定するときまで4℃で保存した。

【0053】 CYP2C8エクソンの配列

DNA断片をゲノムDNAより、ゲノムコンティング配列(NT 008878)に基づくイントロン配列中に設計された適当なCYP2C8特異的プライマーのセットを用いて増幅した。その後、PCR Product Pre-Sequencing Kit (USB Co., Cleveland, OH)を用いて精製したPCR産物を両鎖について、ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて直接配列決定した。過剰な色素をDyeEx96 plate (Qiagen)を用いて除去した。溶出液をABI Prism 3700DNA Analyzer (Applied Biosystems)により分析した。

【0054】73の日本人樹立セルラインから抽出されたゲノムDNAの配列を決定することにより、CYP2C8遺伝子中に9個のSNPsを検出した(表1)。4つのSNPsはエクソン中に、他の4つはイントロン、そしてもう1つは3'-非翻訳領域(3'-UTR)中に位置していた。そのうち、3つのエクソンのSNPsは、アミノ酸の変異につながった(g416A, R139K; a1196g, K399R; c1210g, P404A)。

【0055】

【表1】

配列決定により確認した。

【0057】細胞培養及び過性トランスフェクション ヒト肝癌セルラインHep G2細胞をベシニン、ストレプトマイシン、及び、10%ウシ血清を加えたDulbecco's Modified Eagle Medium中、5%CO₂下、37℃で培養した。トランスフェクションの前日、細胞(1.5×10^6 細胞)を10cm培養皿に接種した。培養24時間後、細胞を無血清OPTI-MEM (Life Technologies, Rockville, MD)で洗浄した。7µgの野生型CYP2C8、その3つの単一変異体、及び、1つの二重変異体プラスミド、または、空OpCR3.1プラスミドをLipofectAMINE PLUS 試薬(Life Technologies)を用いて、製造者の指示に従ってトランスフェクトした。トランスフェクトしたCYP2C8の発現レベルは、約24時間の培養後にピークに達したので(データ示さず)、24時間後、細胞をミクロソーム調製、または、総RNA調製のた

めにRneasy kit (Qiagen)により回収した。

【0058】ミクロソーム調製

HepG2細胞を氷冷したリン酸緩衝液(pH 7.4)で2回洗浄後、氷冷した0.25 M Sucrose, 25 mM KCl, 0.5 mM EDTAを含む50 mM カリウムリン緩衝液(pH 7.4)中でディッシュより剥離した。1,000 x gで5分間(4℃)遠心して沈殿させた細胞を前記緩衝液中で超音波処理およびホモジナイザーによりホモジナイズして破砕した。破砕した細胞を9,000 x gで10分間(4℃)遠心後、さらにその上清を105,000 x gで60分間(4℃)遠心して沈殿を得た。残存する細胞質画分を除くため、この沈殿を150 mM KClを含む50 mM カリウムリン緩衝液(pH 7.4)に再懸濁後、さらに105,000 x gで50分間(4℃)遠心して沈殿を得た。沈殿を10% Glycerolを含む50 mM カリウムリン緩衝液(pH 7.4)に再懸濁し、ミクロソーム画分とした。

【0059】ウェスタンブロットニング

CYP2C8及びその変異体のHep G2細胞の一過性発現のレベルを決定するため、ミクロソーム画分(蛋白質30 µg)をSDSサンプルバッファー中に溶解し、8% SDSポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、ニトロセルロース膜(Schleicher & Schuell Inc., Dassel, Germany)に移した。免疫染色のため、ウサギ抗-ヒトCYP2C8ポリクローナル抗体(Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ)、または、ウサギ抗-カルネキシンポリクローナル抗体(StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, BC, Canada)のどちらかを一次抗体とし、¹²⁵I-標識抗ウサギIgG(Fab)₂断片(2×10⁶ cpm)(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)を二次抗体として使用し、BAS-1500 (Fuji Film, Tokyo, Japan)でデータを分析した。ミクロソーム画分中のCYP2C8含有量は、バンド強度を標準CYP2C8発現細胞ミクロソーム(Gentest Corporation, Woburn, MA)のバンド強度と比較して算出した。

【0060】図1に空のプラスミド、野生型、または、その変異体プラスミドでトランスフェクトしたHep G2細胞のミクロソーム画分中のCYP2C8蛋白質の発現レベルを示す。ミクロソーム中の小胞体(ER)含有量は、ER-固有蛋白質カルネキシン(Williams D.B., Biochem. Cell Biol. 73:123-132 (1995))のイムノブロットにより評価し(図1)、CYP2C8の発現レベルの標準化に使用した。変異体P404Aの発現レベルは野生型の発現レベルと比べて46.4±5.0%に減少していた。変異体K399Rの発現レベルもまた40.4±2.4%に減少していた。付加的に139位をアルギニンからリジンに変異させ、二重変異体(R139K/K399R)とすることにより発現レベルはもとに戻るようであった。

【0061】ノーザンブロット分析

以前に報告されているようにグリオキサルを変性剤として用いてノーザンブロット分析を行った(Brown T., Mackey K., "Current Protocols in Molecular Biology

vol. 37, Unit 4.9, Ausubel F.M. et al.編, John Wiley & Sons Inc., New York (1997))。CYP2C8のハイブリダイゼーションプローブとして、野生型CYP2C8/pCR3.1プラスミドをHind III及びXho Iで切断し、断片をアガロースゲルよりQIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いて抽出した。コントロールプローブとして、グリセラルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ断片(G3PDH)を、フォワードプライマー(5'-TCAGAGTCGAGTCAACCGATTTCGT-3'/配列番号:3)、及びリバースプライマー(5'-CATGTGGCCATGAGTCCACCAC-3'/配列番号:4)、並びにコントロールcDNA(Clontech, Palo Alto, CA)を鋳型として用いて増幅した。これらの断片を[α-³²P]デオキシCTP(Amersham Pharmacia Biotech.)でRediprime II Random Prime Labelling System(Amersham Pharmacia Biotech.)を用いて標識し、C-50 Micro Column(Amersham Pharmacia Biotech.)で精製し、ハイブリダイゼーションに用いた。

【0062】蛋白質レベルが減少する変異体K399R及びP404AのmRNAレベルをトランスフェクトしたHep G2細胞中で調べ、両方のmRNA発現レベルが野生型のレベルとほとんど同じであることを発見した(図2)。

【0063】これらの結果は、K399R及びP404Aの蛋白質発現レベルの減少は、これらのプラスミドの低トランスフェクション効率によるのではないことを示唆する。この蛋白質発現の減少は、CYP2C8 10において示唆されるように(Johansson I. Et al., Mol. Pharmacol. 46:452-459 (1994); Fukuda T. et al., Arch. Biochem. Biophys. 380:303-308 (2000))、成熟蛋白質の安定性がこれらのアミノ酸変異により減少することによると考えられる。実際、変異体K399Rでは二次構造の変化は何等予測されなかったが、変異体P404Aの二次構造においては、Chou-Fasman二次構造予測ソフトウェアによりturn-to-helix変化の可能性が予測された。

【0064】【実施例3】CYP2C8変異体のパクリタキセル6α-ヒドロキシラーゼ活性
野生型CYP2C8及びその変異体のパクリタキセル6α-ヒドロキシラーゼ活性を、それによりトランスフェクトしたHep G2細胞からのミクロソーム(150 µg蛋白質)を用いて決定した。実施例2と同様にミクロソーム画分を調製し、以下の6α-ヒドロキシラーゼ活性の測定に用いた。

【0065】パクリタキセル6α-ヒドロキシラーゼ活性の分析

パクリタキセル6α-ヒドロキシラーゼの活性を以下の方法により測定した。インキュベーション混合物は基質として、2.0~6.7 µMのパクリタキセル、150 µgのミクロソーム蛋白質(これらの蛋白質含有量は、カルネキシンのイムノブロットにより評価した小胞体含有量により標準化した; 図1)、及び、1mM NADPH (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan)を最終容積0.5 mlの50mM リン酸カリ

ウムバッファー (pH 7.4) 中に含んでいた。37℃での1分間の前培養の後、反応をNADPRの添加により開始した。混合物を37℃で30分間インキュベートし、3mIの酢酸エチルで反応を止めた。混合物を内部標準 (800pmolの7,13-ジアセチルバチン III (Alexis Biochemicals, San Diego, CA)) で刺激し、1分間激しく攪拌した。6,000×gで15分間遠心した後、有機相を40℃で窒素の緩やかな流れの中で蒸発させた。残余物を250μlの50% (v/v) メタノールに再溶解した後、試料から50μlをHPLCに付した。Inertsil ODS-80A カラム (内径4.6mm×150mm, 5μm; GLSciences Inc., Tokyo, Japan) を備えたLC-VPシステム (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) を用いてHPLC分析を行った。パクリタキセルの6-α-ヒドロキシ化物を水-アセトニトリル-メタノール (55:36:10) で、流速1.2mI/分でアイソクラチック溶出した。230nmのUV吸収、カラム温度40℃で検出した。パクリタキセル6-α-ヒドロキシラーゼ活性のミカエリス-メンテンパラメーター (見かけのKm及びVmax) をEnzymeKineticsソフトウェア (Trinity Software, Campton, N.H.) を用いてラインウィーバー-バークプロットを分析することにより評価した。

【0066】野生型及びその変異体のパクリタキセル6-α-ヒドロキシラーゼ活性は、62.5~500μgのミクロソーム蛋白質について直線的に増加した。表2には、mg蛋白質に基づいた反応速度パラメーターをまとめて示す。

【0067】

【表2】

野生型及び変異体 CYP2C8 のパクリタキセル 6-α-ヒドロキシラーゼ活性の動力学的パラメーター

変異	K _m (μM)	V _{max} (pmol/分/g 蛋白質)	V _{max} /K _m (μl/分/g 蛋白質)
野生型	16.2±3.2	102±16.0	6.33±0.26
R139K	14.6±2.9	54.8±7.6*	3.78±0.25**
K399R	22.1±4.7	68.3±11.0*	3.11±0.20**
R139K/K399R	15.1±3.4	71.1±12.2(a)	4.75±0.43**
P404A	21.5±8.5	72.8±17.0(a)	3.44±0.26**

データは全て3連実験の平均±SDである。

(a) p<0.1, *p<0.05, **p<0.01対 野生型 (学生t検定)

【0068】野生型CYP2C8では、ヒト肝臓ミクロソームについて得られた値 (前掲、WalleT.) に匹敵するKm及びVmax値が得られた。変異体R139K/K399R (CYP2C8*) は、その単一変異体R139K及びK399Rと同じように、Vmaxおよびクリアランス (Vmax/Km) について減少した値を示した。変異体R139K/K399R蛋白質の発現レベルは野生型のそれと同じであった (図1) ので、この低いヒドロキシラーゼ活性はVmaxのpmol CYP2C8-基準値 [29.8±1.2 (野生型) から19.6±1.5 (R139K/K399R) pmol/分/pmo 1 CYP2C8, P<0.001] 及びクリアランス [1.88±0.28 (野生型) から1.34±0.32 (R139K/K399R) μl/分/pmo 1 CYP2C8, P<0.1] に反映されていた。

【0069】変異体P404Aもまた、有意により低いクリアランスを示した。そのKm値には有意な増加は見られなかった。この減少はより少ない蛋白質量のためと考えられた。実際に、pmol CYP2C8に基づくクリアランス

は、野生型のクリアランスと有意な差はなかった [野生型の1.88±0.28に対して2.55±0.72 (P404A) μl/分/pmol CYP2C8であった]。

【0070】今回の結果は、CYP2C8遺伝子の二重変異体 (R139K/K399R, CYP2C8*) のみならず、新規変異体P404Aのパクリタキセルの代謝効率が悪いことを示す。変異体CYP2C8対立遺伝子を有する患者のパクリタキセルの薬物動力学を評価することは臨床的に重要なことである。

【0071】

【発明の効果】本発明により、CYP2C8により代謝される薬物を医薬品として投与する場合に、CYP2C8により代謝される薬物の投与量を調節し、その副作用を避ける方法が提供される。より具体的には、本発明によりCYP2C8により代謝される薬物の投与による副作用を抑制するためのCYP2C8遺伝子の多型を利用した検査方法、及び該方法において使用するための検査薬、並びに、多型遺伝子を利用したスクリーニング方法が提供される。

【0072】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> National Institute of Health Sciences
- <110> The Organization for Pharmaceutical Safety and Research
- <110> Genex Research, Inc.
- <120> Relation between polymorphism of the metabolic enzyme CYP2C8 and drug metabolism
- <130> GI-A0107
- <140>

21

22

```

<141>
<160> 4
<170> Patent In Ver. 2.1
<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 1
aaggttcaa tggaaacctt
<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 2
tcagcagcca gatgggctag c
<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 3
tgaaggtcgg agtcaacgga ttggt
<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 4
catgtgggccc atgaggcca ccac

```

19

21

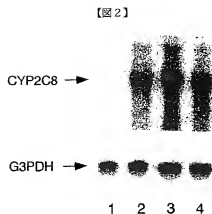
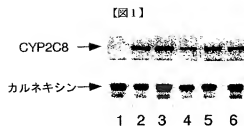
26

24

【図面の簡単な説明】

【図1】 CYP2C8蛋白質のイムノブロットの結果を示す写真である。レーン1：空のプラスミド；レーン2：野生型；レーン3：R139R；レーン4：K399R；レーン5：R139K/K399R；レーン6：P404A。

【図2】 野生型CYP2C8、並びに、その2つの変異体（K399R及びP404A）をコードするmRNAのノーザンブロット解析の結果を示す写真である。レーン1：空のプラスミド；レーン2：野生型；レーン3：K399R；レーン4：P404A。



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

G 0 1 N 33/53

33/566

識別記号

F I

G 0 1 N 33/566

C 1 2 N 15/00

テマコード (参考)

Z N A A

(72) 発明者 澤田 純一

東京都世田谷区上用賀 1-18-1 国立医
薬品食品衛生研究所内

(72) 発明者 小澤 正吾

東京都世田谷区上用賀 1-18-1 国立医
薬品食品衛生研究所内

(72) 発明者 塩岡 伸光

東京都世田谷区上用賀 1-18-1 国立医
薬品食品衛生研究所内

(72) 発明者 齋藤 嘉朗

東京都世田谷区上用賀 1-18-1 国立医
薬品食品衛生研究所内

F ターム (参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13
DA14 DA36 FB02

4B024 AA01 BA08 CA02 DA03 BA17

4B063 QA13 QA18 QQ08 QQ22 QQ42

QQ52 QQ95 QR02 QR32 QR35

QR55 QR62 QR67 QR77 QR84

QS25 QS34